

国内火鸡体内霉形体的分离与鉴定

张敬仁

(北京农业大学兽医学院)

冀锡霖

(中国兽药监察所)

摘 要

从北京和呼和浩特市4个火鸡场的95只火鸡、50只火鸡胚和42份精液样品中分离到15个分离物,用国际霉形体分类分会推荐的生化、遗传学和血清学方法证明其中有两个分离物是两种霉形体混合物,共17株霉形体。所有分离物在无抑菌剂的培养基上连续传代5次未出现细菌形态、对毛地黄皂苷敏感、不水解尿素、DNA的G+C含量介于26-31mol%之间。生长抑制试验和间接表面免疫荧光技术的试验结果将其中的15个株分属于霉形体属的5个种,即鸡毒霉形体(*Mycoplasma gallisepticum*)4株、滑液霉形体(*M. synoviae*)2株、衣阿华霉形体(*M. iowae*)1株、鸡霉形体(*M. gallinarum*)和雏鸡霉形体(*M. pullorum*)各4株。其余2株也属霉形体属,但尚未鉴定到种。

关键词 火鸡, 霉形体, 分离鉴定

从火鸡上分离到的霉形体有15个种,其中鸡毒霉形体(*M. gallisepticum*)、滑液霉形体(*M. synoviae*)和火鸡霉形体(*M. meleagridis*)感染火鸡能引起呼吸道疾病或关节炎。一些学者认为衣阿华霉形体(*M. iowae*)也是对鸡和火鸡致病的一个霉形体种,其他种则被认为是可疑病原和非病原霉形体^[9]。

禽源霉形体最初由Adler等人^[1]分为不同的血清型,以后这些血清型被正式定名为种。国际霉形体分类分会为霉形体分类鉴定推荐了一系列生化、遗传学和血清学方法^[7]。

国内许多学者对鸡霉形体病的免疫、诊断与防治等方面作过报道^[11~14]。近年来我国从国外先后引进了大量种火鸡并已在许多地区推广饲养,但迄今尚未有人对国内火鸡的霉形体进行调查研究。

本文介绍作者在北京和呼和浩特市4个火鸡场分离霉形体并进行鉴定的结果。

材料与方 法

一、试验材料

(一)火鸡和火鸡胚:共用137只成年火鸡和50只火鸡胚,其中42只外表健康的种用成年火鸡仅供采精液用;55只病火鸡(曾用庆大霉素和土霉素等全身或局部治疗过)和40只外表健康的火鸡从眶下窦、气管、肺、气囊和泄殖腔等部位取材分离。火鸡胚为

* 本文于1987年12月10日收稿。

孵化期满不出壳的胚，部分胚的蛋壳已敲破。以上材料来自北京一个火鸡场和呼和浩特市3个火鸡场。

(二) 霉形体模式株及其抗血清：试验用的霉形体模式株由丹麦FAO/WHO国际动物霉形体中心的Freundt E. A.教授赠送。这些模式株为：鸡毒霉形体PG31、滑液霉形体WVU1853、火鸡霉形体17529、衣阿华霉形体695、鸡霉形体 (*M. gallinarum*) PG16、雏鸡霉形体 (*M. pullorum*) CKK、惰性霉形体 (*M. iners*) PG30。

各霉形体株的抗血清除鸡毒霉形体及滑液霉形体抗血清自制外，其余均由Freundt, E. A.教授提供。抗血清制备参考Freundt等^[4]的方法进行。

二、培养基与分离培养

(一) 培养基：参考Yamamoto介绍的配方并作了一些修改后使用^[10]。PPL0肉汤粉21g、盐酸精氨酸2.5g加无离子水700ml，115℃高压灭菌20分钟，然后补加以下无菌成分：灭能猪血清150ml，酵母自溶物10ml，醋酸铵1/4000 (w/v)，青霉素1000单位/ml，NAD (辅酶I) 和盐酸半胱氨酸各1/1000 (W/V)，酚红1/100000 (w/v)。用1N NaOH调pH到7.4左右。

固体培养基中不加酚红，另加1% Noble琼脂 (Difco) (w/v)。

(二) 分离培养：参考Jordan介绍的方法^[6]。

用无菌棉拭在火鸡的眶下窦、气管和泄殖腔涂擦，用该棉拭接种液体和固体培养基；肺和气囊的分离用剪碎的组织接种培养；火鸡胚的卵黄和精液较为粘稠，先用液体培养基稀释后再接种培养。

固体培养物置37℃、含5% CO₂和保持一定温度的条件下培养，4—7日后观察菌落生长。液体培养物加胶塞于37℃下培养，以培养液的颜色变化判断生长情况。初次接种的培养物5天左右传代一次，传3代后无生长判为分离阴性。

三、分离物的特性鉴定

(一) 生物学特性鉴定：首先用光学显微镜观察分离物在固体培养基上的菌落形态，以姬姆萨染色观察菌体形态。霉形体的菌落为典型的“油煎蛋”样，菌体呈多形 (初次分离的培养物接种固体琼脂菌落有时不典型)。将分离物在不加醋酸铵和青霉素的液体培养基上连续传代5次，最后接种固体培养基观察菌落形态，以此鉴定分离物是否属于细菌L-型。液体培养物在450nm孔径的滤膜滤器中过滤后接种固体培养基，观察分离物是否能透过滤膜。

(二) 生化特性鉴定 1. 毛地黄皂苷敏感试验：间接测定分离物对固醇的需求。参照Tully的方法进行^[8]。2. 葡萄糖、精氨酸与尿素利用试验：参照Freundt等的方法进行^[4]。3. 四氮唑还原试验：液体培养基中不加酚红，另加0.02% (w/v) 氯化三苯基四氮唑，接种后1周培养液从无色透明变为砖红色，对照管不变色为阳性。

(三) 血清学鉴定：国际霉形体分类分会推荐了3种鉴定霉形体的血清学方法，即生长抑制试验、代谢抑制试验和荧光抗体技术^[7]。作者采用其中的生长抑制试验和间接表面免疫荧光技术鉴定分离物。1. 生长抑制试验：参考Clyde介绍的方法进行^[8]。用霉形体抗血清制成无菌滤纸片，抑制带2mm以上为生长抑制阳性。2. 间接表面免疫荧光试验：参考Gardello等的方法^[5]。用霉形体抗血清处理固体培养基上的菌落，然后以

荧光素标记的羊抗兔IgG(购自卫生部生物制品研究所,效价为1:16)染色,最后在荧光显微镜下观察荧光染色强弱。++以上荧光反应为阳性。

(四)DNA的G+C含量测定:参见《中国兽药监察所研究论文集》第10卷。

结 果

一、分离结果 从全部材料中培养出15个分离物,即IM₁₋₄, IMS₁₋₇, J-1, GXT_{1,2}, NT-1。其中从火鸡胚和精液中各分离到1个,另外13个分离物均来自眶下窦和气管材料,其余部位未分离成功(见表1)。

表1 各种材料的分离结果

取材部位	精液	胚	眶下窦	气管	气囊	关节	泄殖腔
样品数*	42	50	95	69	17	8	7
分离阳性数	1 (NT-1)	1 (J-1)	7 (IMS ₁₋₇)	6 (IM ₁₋₄ , GXT ₁₋₂)	0	0	0

*每只火鸡的取材部位数计为样品数。

二、生物学特性鉴定结果 各分离物初代培养在液体培养基上需1周左右出现色泽变化,盲传3—5代后,1—3天即可。在固体培养基上初代分离物需5—10天方能在光镜下出现边缘不整齐、生长中心不明显的菌落,传3代后菌落呈典型的“油煎蛋”状,中心致密,边缘色泽较淡。菌体在光镜下呈短杆状或丝状的多形形态。

经滤膜过滤处理的培养液接种固体培养基5天左右有“油煎蛋”样菌落生长。在无抑菌剂的培养基上不恢复细菌形态。

三、生化试验 15个分离物都毛地黄皂苷敏感,抑制带为4—15mm之间,不水解尿素,其中9个分离物发酵葡萄糖,5个水解精氨酸,1个既发酵葡萄糖又水解精氨酸,也还原四氮唑,其余14个分离物均不还原四氮唑(见表2)。

表2 分离物生化试验结果

结果 试验项目	模 式 株						分 离 物		
	PG31	WVU1853	17529	DG16	695	CKK	IM ₁₋₄ IMS ₁₋₃	J-1 IMS ₄₋₇	NT-1
G	+	+	-	-	+	+	+	-	+
A	-	-	+	+	+	-	-	+	+
T	-	-	-	-	+	-	-	-	+
U	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*G=葡萄糖发酵, A=精氨酸水解, T=四氮唑还原, U=尿素水解, D=毛地黄皂苷敏感。

四、血清学试验结果 (一)生长抑制试验:分离物在其相应种的霉形体抗血清纸片四周出现3mm以上的抑制带。其对应关系为:GXT_{1,2}—鸡毒霉形体抗血清, IMS₄₋₇—鸡霉形体抗血清, IM_{3,4}, IMS₁, IMS₃—雏鸡霉形体抗血清, NT-1—衣阿华霉形体抗

血清。IM₁与IM₂两分离物未克隆培养物在鸡毒霉形体抗血清纸片四周4mm范围内只有极少数菌落生长，其他霉形体则不能抑制其生长。J-1和IMS₂分别在火鸡霉形体和鸡毒霉形体抗血清纸片周围有1.5mm宽的抑制带，根据判定标准判为非特异性抑制。(二)间接表面免疫荧光试验：GXT-1，GXT-2固体培养物与鸡毒霉形体反应后以荧光素标记的羊抗兔IgG作用，菌落在荧光显微镜下呈亮绿色，IMS₄₋₇与鸡霉形体抗血清，IM_{3,4}，IMS_{1,3}与雏鸡霉形体抗血清，NT-1与衣阿华霉形体的反应物被荧光抗体染成强阳性。未经克隆的IM₁与IM₂两分离物用6种霉形体抗血清同时作用，鸡毒霉形体抗血清处理的标本上，大部分菌落被染成强荧光，少数菌落只与滑液霉形体抗血清结合染成强荧光。J-1和IMS₂与试验的霉形体抗血清均为阴性反应。J-1与惰性霉形体(*M. iners*)抗血清呈阴性荧光反应。

五、DNA的G+C含量 提取各分离物的DNA，利用变性温度法测定了G+C含量，结果分布于26-34ml%之间。

根据以上各项试验结果，GXT₋₁，GXT₋₂为鸡毒霉形体(*M. gallisepticum*)；IM₃，IM₄，IMS₁，IMS₃为雏鸡霉形体(*M. pullorum*)；IMS₄，IMS₅，IMS₆，IMS₇为鸡霉形体(*M. gallinarum*)；NT-1为衣阿华霉形体(*M. iowae*)；IM₁和IM₂为鸡毒霉形体与滑液霉形体(*M. synoviae*)的混合物，鸡毒霉形体占多数。J-1和IMS₂两个分离物不属于鉴定用的6种霉形体，J-1也不与惰性霉形体(*M. iners*)抗血清特异性结合。

讨 论

分离试验得到的15个分离物在含青霉素和醋酸铊的固体培养基上形成典型的“油煎蛋”样菌落，光学显微镜下菌体呈多形，能通过450nm孔径的滤膜，说明最可能是柔皮体门(Tenericutes)、软皮体纲(Mollicutes)的成员。各分离物的G+C含量介于26-34ml%之间，在无抑菌剂的培养基上连续传代5次未出现细菌形态，从而证实了以上的结论。软皮体纲共6个属，即霉形体属(*Mycoplasma*)、无胆甾体属(*Acholeplasma*)、尿原体属(*Ureaplasma*)、螺原体属(*Spiroplasma*)、厌氧原体属(*Anaeroplasm*)和热原体属(*Thermoplasma*)。对毛地黄皂苷敏感、不水解尿素、菌体不呈螺旋形、在37℃能正常发育以及有氧环境下能生长等特性分别排除了后5个属的可能性，而与霉形体属的特性完全一致，由此确定这些分离物的分类地位为柔皮体门、软皮体纲、霉形体目(Mycoplasmatales)、霉形体科(Mycoplasmataceae)、霉形体属。生长抑制试验和间接表面免疫荧光试验将这些分离物中的13个鉴定为5个霉形体种，即鸡毒霉形体、滑液霉形体、衣阿华霉形体、鸡霉形体和雏鸡霉形体。IMS₂和J-1尚未鉴定到种，根据生化试验结果和G+C含量的大小，不能排除IMS₂为家禽霉形体(*M. gallinaceum*)、吐授鸡霉形体(*M. gallipavonis*)和嗜糖霉形体(*M. lipophilum*)之一的可能性，因这三种霉形体都发酵葡萄糖，G+C含量都在28ml%左右。J-1可能是以往未曾在火鸡中发现的一个霉形体种，但不能肯定是否属于新的霉形体种。这两个分离物与部分霉形体抗血清出现的生长抑制现象为非特异性抑制，Clyde认为1.5mm以下的抑制带是难以判断的[8]，Freundt建议生长抑制试验的阳性，判定标准应在2mm以上[4]，免疫荧光试验的结果也证实了这一点。Bradbury等人也报道了类似现象，并且认为这种

非特异性抑制可能是这些霉形体对一些兔血清中的某些成分敏感所致〔2〕。

鸡毒霉形体和滑液霉形体为鸡和火鸡霉形体病的共同病原，因此在霉形体病的综合防治方面有十分重要的意义，毕丁仁等人从国内鸡体中分离到这两种霉形体〔10〕。本试验分离到的鸡毒霉形体和滑液霉形体都来自患眶下窦炎的病火鸡，由于未做发病试验不能确定其致病性，但从文献报道和分离材料所提供的初步依据来看，似乎与火鸡的眶下窦炎有关。衣阿华霉形体以前被认为是可疑病原霉形体，但近年来一些学者发现这种霉形体能致死鸡胚和火鸡胚，引起幼龄鸡和火鸡的腱鞘炎和骨质畸形〔9〕，鉴于未做发病试验，本试验分离的衣阿华霉形体（NT-1）是否对鸡和火鸡有致病性，尚待进一步试验确定，这种霉形体的分离在国内尚无前例。

本试验的结果表明，国内的火鸡体内存在霉形体感染，并且不止一种霉形体，其中包括一些国际上确认致病的种。

参 考 文 献

- 〔1〕 Adler, H. E., Yamamoto, R. and Berg, J., 1957. Strain differences of pleuropneumonia-like organisms of avian origin. *Avian Dis.* 1: 19~26.
- 〔2〕 Bradbury, J. M., Forrest, M. and Williams, A., 1983. *Mycoplasma lipofaciens*, a new species isolated from avian origin. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 329~335.
- 〔3〕 Clyde, W. A. Jr., 1983. Growth-inhibition test. In "Methods in mycoplasmaology" (Razin, S. and Tully, J. M. eds). 1: 405~410. A. P. New York, London.
- 〔4〕 Freundt, E. A., 1979. Identification of mycoplasma. In "Methods in microbiology" (Bergan, T. and Norris, J. R. eds). 13: 377~394. A. P. New York, London.
- 〔5〕 Gardello, R. S., Delguidice, R. A. and Tully, J. G., 1983. Immunofluorescence. In "Methods in mycoplasmaology" (Razin, S. and Tully, J. G. eds). 1: 431~437. A. P. New York, London.
- 〔6〕 Jordan, F. T. W., 1983. Recovery and identification of avian mycoplasmas. In "Methods in mycoplasmaology" (Razin, S. and Tully, J. G. eds). 2: 68~80. A. P. New York, London.
- 〔7〕 Subcommittee on the taxonomy of mycoplasmas, international committee of systematic bacteriology, 1979. Proposal of minimal standards for descriptions of new species of the class Mollicutes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29: 172~180.
- 〔8〕 Tully, J. G., 1983. Tests for digitonin sensitivity and sterol requirement. In "Methods in mycoplasmaology" (Razin, S. and Tully, J. G. eds). 1: 355~362. A. P. New York, London.
- 〔9〕 Yamamoto, R., 1985. Diagnosis of avian mycoplasmosis. *La Clinica veterinaria*. 108: 75~81.
- 〔10〕 Yamamoto, R., Ortmyer, H. B. and Saif, Y. M., 1983. *Mycoplasma meleagridis* infection. AAAP Slide Set 13.
- 〔11〕 毕丁仁、冀锡霖, 1984, (1) 北京, 南宁两地区鸡体内霉形体菌丛的初步研究。(2) 用表面免疫荧光法鉴定鸡源霉形体。中国兽药监察所研究生论文8404。
- 〔12〕 冀锡霖, 宁宜宝, 1986, 鸡感染鸡毒霉形体和滑液霉形体情况的调查。中国兽医科技, (12): 21-23。
- 〔13〕 李跃庭, 1981, 鸡败血支原体甲醛灭活苗气雾免疫效果观察。兽医科技杂志, (7): 22~24。
- 〔14〕 王锡坤等, 1982, 禽败血支原体MG-7601株对来航鸡的感染及免疫原性试验。家畜传染病, (1): 35~41。

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MYCOPLASMA FROM TURKEYS

Zhang Jingren

(*Beijing Agricultural University*)

Ji Xilin

(*Chinese Control Institute of Veterinary Bioproducts
and Pharmaceuticals*)

Abstract

Fifteen isolates were obtained and identified from ninety-five turkeys, 50 turkey embryos and 42 samples of the turkey semen collected from turkey farms in Beijing and Inner Mongolia through biochemical, genetic and serological methods recommended by Subcommittee on the Taxonomy of Mollecutes, International Committee on Systematic Bacteriology. All isolates formed typical "fried eggs" colonies on agar medium and showed very small size and pleomorphic shape under microscope, in addition to filterability through 450nm pore diameter membrane filters. The organisms did not revert to bacterial form through 6 consecutive subcultures in medium free from antibiotics. The guanine plus cytosine content of the DNAs ranged between 26-34 mol%. These findings revealed that 15 isolates belong to class Mollecutes, order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae, genus Mycoplasma. By the disc growth-inhibition test and indirect epi-immunofluorescence technique, 2 of 15 isolates proved to be *Mycoplasma gallisepticum*, 4 *M. gallinarum*, , 4 *M. pullorum*, 1 *M. iowae*, 2 mixed cultures of *M. gallisepticum* and *M. synoviae*. The remaining 2 isolates could not be assigned to any of the 5 species mentioned above as well as *M. meleagridis*. One of them seemed to be distinguished from all of the previously recognized mycoplasma species from turkey origin.

Key words Turkeys, Mycoplasmas, Isolation and identification